

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **11153601 A**(43) Date of publication of application: **08 . 06 . 99**

(51) Int. Cl.

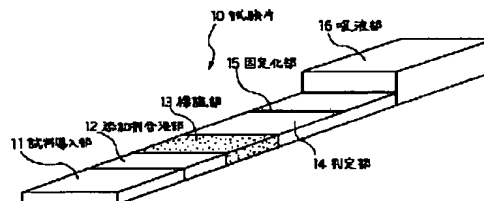
G01N 33/543
G01N 33/536
(21) Application number: **10265549**(22) Date of filing: **18 . 09 . 98**
(30) Priority: **18 . 09 . 97 JP 09253072**
18 . 09 . 97 JP 09253074
(71) Applicant: **MATSUSHITA ELECTRIC IND CO LTD**
(72) Inventor: **OKA YOSHIKAZU**
SHIGEFUJI OSAYUKI
MIYAZAKI KIMIMASA
(54) **IMMUNITY CHROMATOGRAPHY DEVICE**

COPYRIGHT: (C)1999,JPO

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide the immunity chromatography device which can accurately and speedily detect an antigen in an aqueous sample by eliminating a decrease in S/N ratio and malfunction due to the coloring of a background and the generation of a blank at the time of detection and to widen the dynamic range of reaction by improving sensitivity and shortening a reaction time.

SOLUTION: An additive immersion part 12 is provided between a sample introduction part 11 and a decision part 14 for a porous carrier constituting a test-piece 10 and at least one kind among a surface active agent, ammonium salt and a pH buffer is eluted in a sample and carried there so that it can migrate in the carrier together with the sample. Further, a titled part 13 carrying a titled antigen is divided into a plurality of parts. Further, a flow passage through which the sample reaches the decision part 14 directly through neither an end part of the titled part 13 nor the titled part 13 itself is provided in addition to a flow passage through which the sample reaches the decision part 14 through the titled part 13 in series.



(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-153601

(43) 公開日 平成11年(1999) 6月8日

(51) Int.Cl.⁶

G 0 1 N 33/543
33/536

識別記号

5 2 1

F I

G 0 1 N 33/543
33/536

5 2 1

A

審査請求 未請求 請求項の数15 O L (全 10 頁)

(21) 出願番号 特願平10-265549

(22) 出願日 平成10年(1998) 9月18日

(31) 優先権主張番号 特願平9-253072

(32) 優先日 平9(1997) 9月18日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(31) 優先権主張番号 特願平9-253074

(32) 優先日 平9(1997) 9月18日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000005821

松下電器産業株式会社
大阪府門真市大字門真1006番地

(72) 発明者 岡 美和

大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器
産業株式会社内

(72) 発明者 重藤 修行

大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器
産業株式会社内

(72) 発明者 宮崎 仁誠

大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器
産業株式会社内

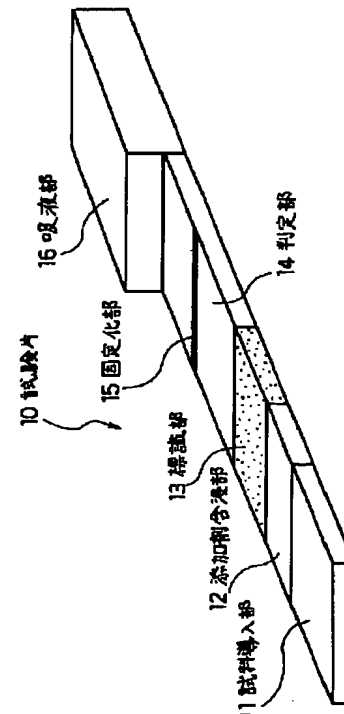
(74) 代理人 弁理士 東島 隆治 (外1名)

(54) 【発明の名称】 免疫クロマトグラフィー装置

(57) 【要約】

【課題】 検出時に生じるバックグラウンドの着色やブランクの発生による、S/N比の低下や誤動作をなくし、水性試料中の抗原を正確、かつ迅速に検出できる免疫クロマトグラフィー装置を提供する。また、感度の向上と反応時間の低減を図り、反応のダイナミックレンジを拡大する。

【解決手段】 試験片を構成する多孔質担体の試料導入部から判定部までの間に添加剤含浸部を設け、そこに界面活性剤、アンモニウム塩、およびpH緩衝剤の少なくとも一種を、試料に溶出して担体内を試料とともに移動できるように担持させる。また、標識抗体を担持している標識部を複数に分割する。さらには、試料が標識部を直列に通過して判定部に至る流路の他に、標識部の端部のみまたは標識部をまったく経由せずに直接判定部に至る流路を設ける。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】 抗原・抗体の特異的結合反応に基づいて水性試料液中の抗原を検出する免疫クロマトグラフィー装置であって、検出対象の抗原に結合する少なくとも 2 種の抗体、および前記抗体の一方を含む標識部と抗体の他方を含む判定部とを試料導入部に導入された試料が標識部を経て判定部に移動するように両者を配列した多孔質担体からなる試験片を備え、前記一方の抗体は化学的に可視化処理が施されており、担体に導入される試料液により溶出し、担体内を試料の移動とともに移動できる状態

10

で担体の標識部に含有され、他方の抗体は担体の判定部に、試料の移動に伴う位置の変化が起きない強度で固定化されており、さらに前記担体には、試料導入部から判定部までの間に添加剤含浸部が設けられ、添加剤含浸部には界面活性剤、アンモニウム塩、および pH 緩衝剤からなる群より選ばれた少なくとも 1 種が、試料液により溶出し、担体内を試料の移動とともに移動できる状態

20

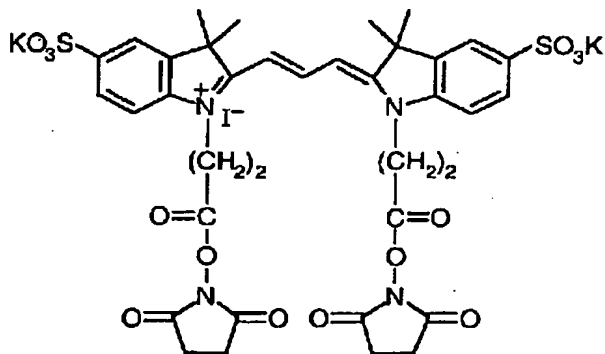
で担持されていることを特徴とする免疫クロマトグラフィー装置。

【請求項 2】 前記標識部は複数に分割されている請求項 1 記載の免疫クロマトグラフィー装置。

【請求項 3】 前記一方の抗体が、金コロイド、ラテックス粒子、有機色素、顔料、金属、金属酸化物、および酵素からなる群より選ばれた少なくとも 1 種と結合して可視化されている請求項 1 記載の免疫クロマトグラフィー装置。

【請求項 4】 可視化処理された抗体が化 1 で示される構造のシアニン系色素で標識された抗体である請求項 1 記載の免疫クロマトグラフィー装置。

【化 1】



【請求項 5】 界面活性剤がアルキルフェノールエーテル系の非イオン界面活性剤である請求項 1 記載の免疫クロマトグラフィー装置。

【請求項 6】 アンモニウム塩がテトラメチルアンモニウム塩である請求項 1 記載の免疫クロマトグラフィー装置。

【請求項 7】 添加剤含浸部における pH 緩衝剤の担持量が、担体の試料導入部にあらかじめ定めた体積の試料を添加したとき、判定部における試料の pH が 8.0 ～

30

40

50

8.5 の範囲になる量である請求項 1 記載の免疫クロマトグラフィー装置。

【請求項 8】 pH 緩衝剤が、ホウ酸、2- (N-モルフォリノ) エタンスルホン酸、トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン、およびリン酸からなる群より選ばれた少なくとも 1 種である請求項 1 記載の免疫クロマトグラフィー装置。

【請求項 9】 分割された 1 つの標識部に担持された標識抗体の含有量が他の標識部に担持された標識抗体の含有量と異なる請求項 2 記載の免疫クロマトグラフィー装置。

【請求項 10】 分割された標識部のうち、判定部に近い側に担持される標識抗体の含有量が判定部に遠い側の標識部に含有される標識抗体の量よりも多い請求項 9 記載の免疫クロマトグラフィー装置。

【請求項 11】 試料が複数の標識部を直列に通過して判定部に至る流路の他に、標識部の一部を経由するかまたは標識部を全く経由せずに直接判定部に至る流路を有する請求項 2 記載の免疫クロマトグラフィー装置。

【請求項 12】 複数個の標識部間に、試料および標識抗体の移動を許す多孔質材料が介在している請求項 2 記載の免疫クロマトグラフィー装置。

【請求項 13】 さらに、前記担体には、前記試料導入部から標識部の端部を経由するかまたは標識部を経由せずに判定部に至る試料のバイパス流路を有する請求項 1 記載の免疫クロマトグラフィー装置。

【請求項 14】 抗原・抗体の特異的結合反応に基づいて水性試料液中の抗原を検出する免疫クロマトグラフィー装置であって、検出対象の抗原に結合する少なくとも 2 種の抗体、および前記抗体の一方を含む標識部と抗体の他方を含む判定部とを試料導入部に導入された試料が標識部を経て判定部に移動するように両者を配列して設けた多孔質担体を備え、前記一方の抗体は、化学的に可視化処理が施されており、担体に導入される試料液に溶出し、担体内を試料の移動とともに移動できる状態で担体の標識部に含有され、他方の抗体は、担体の判定部に、試料の移動に伴う位置の変化が起きない強度で固定化されており、かつ前記標識部は複数に分割されていることを特徴とする免疫クロマトグラフィー装置。

【請求項 15】 抗原・抗体の特異的結合反応に基づいて水性試料液中の抗原を検出する免疫クロマトグラフィー装置であって、検出対象の抗原に結合する少なくとも 2 種の抗体、および前記抗体の一方を含む標識部と抗体の他方を含む判定部とを試料導入部に導入された試料が標識部を経て判定部に移動するように両者を配列した多孔質担体からなる試験片を備え、前記一方の抗体は化学的に可視化処理が施されており、担体に導入される試料液により溶出し、担体内を試料の移動とともに移動できる状態で担体の標識部に含有され、他方の抗体は担体の判定部に、試料の移動に伴う位置の変化が起きない強度

で固定化されており、さらに前記担体には、前記試料導入部から標識部の端部を経由するかまたは標識部を経由せずに判定部に至る試料のバイパス流路を有することを特徴とする免疫クロマトグラフィー装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、水中の微生物の検出や、体液から極微量のマーカー物質を検出する体外診断薬ないしは携帯用診断装置に係る。さらに詳しくは、分析設備を有していない小規模医院や被験者自身により簡便かつ迅速に測定できる免疫クロマトグラフィー装置の性能向上を図るものである。

【0002】

【従来の技術】尿、汗、血液などの体液から極微量のマーカー物質を検出する体外診断薬は、臨床診断、在宅医療の中心的存在として重要性が認められている。免疫クロマト技術は、抗体の持つ反応特異性を利用した体外診断薬の基盤技術である。なかでも、妊娠検査薬は、すでに一般用医薬品として市場に流通しているもっとも典型的な免疫クロマトグラフィー装置である。女性が妊娠すると、胎盤からヒト絨毛性腺刺激ホルモン（hCG）が分泌され、それが尿中に排泄される。妊娠検査器に女性が尿を添加すると、通常3分間程度で妊娠の陽性・陰性の判定が素人でも簡単にできる。このような免疫クロマトグラフィー装置の代表的な構造が、たとえば米国特許第5,602,040号に開示されている。

【0003】以下に、最も簡単な免疫クロマトグラフィー装置の構造と動作について、妊娠検査器を例にして説明する。図1に典型的な免疫クロマトグラフィー装置に使用される多孔質担体の構造を示す。この多孔質担体1は、抗体の固定のしやすさからニトロセルロースのシートが最も広く用いられている。ただし、全体をニトロセルロースで構成すると、試料の流速が著しく低下するので、判定部だけをニトロセルロースで構成し、その他の部分は試料の流速のより早いガラスろ紙などで構成するのが好ましい。担体の一端にある試料導入部2は、試料が迅速に吸収され、しかしながら保持力は弱く、速やかに反応部に試料が流れていくような性質の、ガラスろ紙などの多孔質担体で構成されている。多孔質担体1を中空のケースに収容する場合は、試料導入部2は比較的長い構成とし、その一部をケースから露出させることによって、直接試料導入部に尿を導入することができる。あるいは、試料導入部もケース内に収納されているときは、ケースに穴をあけておき、そこから試料導入部に、試料を添加することができる。

【0004】標識部3は、金コロイドまたは着色ラテックスに吸着した抗hCG抗体の水溶液をガラスろ紙に含浸させた後、凍結乾燥させることにより作製したものである。判定部4は、ニトロセルロースのシート上に抗体の水溶液を任意の形状に滴下した後乾燥し、洗浄すること

により作製したものである。ニトロセルロースの非常に強固な非特異吸着特性により、抗体がニトロセルロース上に担持されている。抗体を固定化した後、検出反応の際の非特異吸着によるバックグラウンドの発色を防止するため、たとえば牛血清アルブミン（BSA）などで表面処理を施すことができる。この操作はブロッッキングと呼ばれている。担体の他方の端部にある吸液部5は、過剰の試料を迅速に吸収するため、優れた吸液力、吸液容量を有する材料、ガラスろ紙が用いられる。

【0005】試料として、女性の尿をクロマトグラフィー装置の形状にあわせて定められた量（通常0.1～2ml）を試料導入部2に添加する。試料は標識部3を経由し、判定部4を通過して、吸液部5に向かって移動する。その際、標識部3を試料が通過する際には、標識部に担持されていた標識抗体が試料の水分に溶解し試料とともに移動を開始する。その後、溶解した標識抗体は判定部4を通過する。ここで、抗原・抗体の特異的結合反応に基づき、陽性の場合には、判定部で固定化抗体と標識抗体とが抗原を介して反応し、判定部が着色される。陰性の場合には、反応が起こらず、標識抗体が判定部を通過し吸液部に吸収される。これにより、水性試料液中の抗原の有無を判定することができる。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】上記のような免疫クロマトグラフィー装置において、判定部の固定相抗体以外の部分の着色（バックグラウンド）及び検出物質が存在しない場合での固定化相の発色（ブランク）は、検出時のSN比を下げるばかりでなく、誤動作の原因にもなりうる。バックグラウンド着色の原因は、可視化された移動相抗体と多孔質担体との疎水的な結合である。また、ブランク発色の原因は、負電荷を帯びた移動相抗体と正電荷を帯びた固定相抗体との電気的相互作用である。

【0007】通常、検出に用いられる試料には、疎水結合や電気的相互作用を打ち消す効果のある物質、例えば界面活性剤やpH緩衝剤等は含まれていない。従って、従来の免疫クロマトグラフィー装置においては、少なからずバックグラウンドの着色が起こり、場合によってはブランクが発生するという問題があった。これは、有機色素を用いて移動相抗体を可視化したときに、特に顕著にみられる。

【0008】上記の免疫クロマトグラフィー装置において、標識部に担持された標識抗体の量及び濃度を増加させることにより感度の向上を図ることができる。しかしながら、この方法をとると、標識抗体が十分に流れきってバックグラウンドが消色し、目視確認ができるようになるまでの時間が増大する。すなわち、感度の向上と反応時間の低減が相反していた。さらに、試料中に含まれる抗原が大過剰の場合には、移動相の抗体がすべて抗原と反応してしまうことにより、判定部にとどまることができなくなるため、見かけ上抗原が少ないような誤動作

をすることになる。この理由から、免疫クロマトグラフィーには本質的に反応が起きるダイナミックレンジが存在することになり、通常妊娠検査器の場合で反応のダイナミックレンジは50～100,000 IU/Lの範囲であった。また、試料が必ず標識部を経由して判定部に移動するように構成すると、hCGが固定化抗体と反応する前に、標識された抗体と反応してしまうため、低濃度での抗原の検出が不利である。

【0009】本発明は、上記に鑑み、検出時の誤動作の要因となりうるバックグラウンドの着色やブランク発色を除去し、液体試料中の抗原を正確にかつ迅速に検出することができる免疫クロマトグラフィー装置を提供することを目的とする。本発明は、また、感度の向上と反応時間の低減とを同時に達成し、さらには反応のダイナミックレンジを拡大する効果を達成する画期的な免疫クロマトグラフィー装置を提供することを目的とする。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明は、上記課題を解決するために、多孔質担体の試料導入部から判定部までの間に添加剤含浸部を設け、添加剤含浸部には界面活性剤、可溶性アンモニウム塩、およびpH緩衝剤からなる群より選ばれた少なくとも1種が、担体に導入される試料に溶出し、担体内を試料の移動とともに移動できる状態で担持されている免疫クロマトグラフィー装置を提供する。本発明は、また前記標識部が複数に分割されている免疫クロマトグラフィー装置を提供する。

【0011】また、本発明は、抗体の一方を含む標識部と抗体の他方を含む判定部とを試料導入部に導入された試料が標識部を経て判定部に移動するように両者を配列した多孔質担体からなる試験片を備え、前記多孔質担体にはさらに、試料導入部から標識部の端部を経由するかまたは標識部を経由せずに判定部に至る試料のバイパス流路を設けた免疫クロマトグラフィー装置を提供する。

【0012】

【発明の実施の形態】本発明の免疫クロマトグラフィー装置は、抗原・抗体の特異的結合反応に基づいて水性試料液中の抗原を検出するものであって、検出対象の抗原に結合する少なくとも2種の抗体、および前記抗体の一方を含む標識部と抗体の他方を含む判定部とを試料導入部に導入された試料が標識部を経て判定部に移動するように両者を配列した多孔質担体からなる試験片を備え、前記一方の抗体すなわち移動相抗体は、化学的に可視化処理が施されており、担体に導入される試料液に溶出し、担体内を試料の移動とともに移動できる状態で担体の標識部に含有され、他方の抗体すなわち固定相抗体は、担体の判定部に、試料の移動に伴う位置の変化が起きない強度で固定化されている。さらに前記担体には、試料導入部から判定部までの間に添加剤含浸部が設けられ、添加剤含浸部には界面活性剤、可溶性アンモニウム塩、およびpH緩衝剤からなる群より選ばれた少なくと

も1種が、試料液に溶出し、担体内を試料の移動とともに移動できる状態で担持されていることを特徴とする。ここで、添加剤含浸部は、試料導入部と標識部との間に、または試料導入部と一体化して設けることができる。

【0013】試料導入部から判定部までの間に添加剤含浸部を設けることにより、分析時には界面活性剤、アンモニウムイオンまたはpH緩衝剤が試料と混合しながら移動する。そして、この試料は判定部に達した後、吸液部に吸収される。添加剤のうち界面活性剤は、液体試料の表面張力を抑え、試料の流れを助長すると共に移動相抗体の表面特性を改質して多孔質担体との疎水結合力を弱める。その結果、免疫クロマトグラフィー装置を用いた検出時間が短縮でき、さらにバックグラウンドの着色を抑えることが可能となる。一方、アンモニウムイオンは、典型的な正電荷化合物であるため、移動相抗体の負電荷を打ち消す効果がある。また、pH緩衝剤は、導入された試料のpHを制御することにより、固定相抗体の正電荷を相殺することができる。これらの結果として、移動相抗体と固定相抗体との電気的相互作用は解消され、ブランクの発色を除去することが可能となる。

【0014】本発明の好ましい態様において、標識部が複数に分割され、それぞれの標識部の間は、試料および標識抗体の移動を許す多孔質材料をスペーサーとして補完して、試料は分割された標識部を流れる構成をとる。また、この構成に加えて、各標識部に担持された標識抗体の種類および／または絶対量を異なるものにすることができる。標識部を複数に分割し、判定部に近い側の標識部すなわち流路の下流側の標識部に比較的大量の標識抗体を担持し、上流側の標識部には少量の標識抗体を担持させることができる。この構成をとったとき、まず、試料中に大量の抗原があるときには流路の下流側で大量の抗原と大量の標識抗体が共存することになり、抗体が不足を起こすことなく、非常に早い反応の初期に濃い発色を得ることができる。また、試料中の抗原が少量の場合には、前記の下流での大量の標識抗体はあまり反応に寄与しないが、判定部において抗原が濃縮されつつ、後から時間をかけて均一に近い状態で流れてくる標識抗体により発色する。つまり、感度は高いまま維持できる。この場合、後から流れてくる標識抗体の濃度は低い

ため、バックグラウンドは低減したままであり、判定部の発色を妨げることはない。この構成によれば、抗原の高い濃度、低い濃度それぞれで最適な反応系が働くため、結果として感度のダイナミックレンジが向上することになる。

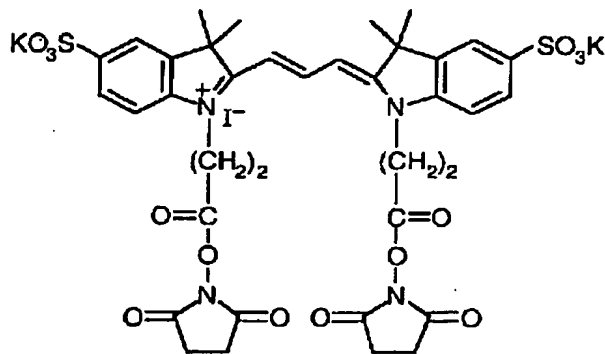
【0015】また、試料が標識部の一部を経由するかまたは標識部を全く経由せずに直接判定部に至るバイパス流路を設ける構成により生じる効果は、試料の流路が2系統に別れることである。つまり、一つの経路は、単純に試料導入部から担体を経由し、判定部に達する。この

経路は最も障害が少なく試料の流れは早く進行する。もう一つの経路は、標識部、好ましくは分割された標識部、を通過することにより、標識部とスペーサとの界面で接触抵抗が生じ、そのために遅延された試料の流路である。いいかえれば、この構成をとることにより、試料を導入すると、まず実質的に試料のみが判定部に達し、一定の時間が経過した後試料によって溶出された標識抗体が判定部に達する。この遅延時間の間に、判定部では、あらかじめ抗原がある程度結合した状態で標識抗体と抗原の混合物を迎えることになり、少量の抗原しか存在していない場合でも効率的にこれを捕らえることが可能となり、結果として感度を向上させることができる。この構成によれば、遅延時間を設けることによって、一見反応時間は増大することになるが、実際には担持する標識抗体の絶対量を増加させることなく感度向上が図れるので、バックグラウンド消失の時間が縮減され、全体としては反応時間は短縮されることになる。

【0016】本発明において、化学的に可視化された抗体、すなわち移動相抗体は、金コロイド、ラテックス粒子、有機色素、顔料、金属、金属酸化物、および酵素のうちのいずれかもしくはこの中のいくつかの組み合わせを結合させることにより、可視化されていることが好ましい。次の構造式(化2)で表されるシアニン系色素は、好ましい色素の例である。

【0017】

【化2】



【0018】本発明の免疫クロマトグラフィー装置は、抗原がhCG、LH(黄体形成ホルモン)、またはCRP(C反応性タンパク質)のいずれかである場合に特に有効である。本発明に用いる界面活性剤としては、アルキルフェノールエーテル系の非イオン界面活性剤が用いられる。トリトン系界面活性剤、なかでもトリトン(Triton)X-100の名で販売されているものが好ましい。アンモニウム塩としては、テトラメチルアンモニウム塩、例えば塩化テトラメチルアンモニウム、臭化テトラメチルアンモニウム、ヨウ化テトラメチルアンモニウムなどが好ましい。添加剤含浸部におけるpH緩衝剤の担持量は、担体の試料導入部にあらかじめ定めた体積の試料を添加したとき、判定部における試料のpHが8.0~8.5の範

囲になる量であることが好ましい。pH緩衝剤は、ホウ酸、2-(N-モルフォリノ)エタンスルホン酸、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン、およびリン酸からなる群より選ばれたものが好ましい。

【0019】図2は、本発明の免疫クロマトグラフィー装置に用いる多孔質担体からなる試験片の構成例を示す。試験片10は、多孔質担体からなり、試料導入部11、添加剤含浸部12、可視化処理が施された移動相抗体を含有する標識部13、固定相抗体の固定化部15を有する判定部14、および吸液部16が順次配列された構成を有する。この試験片は、液体を透過しない材質の中空の容器内に収納される。そして、容器には、外部から担体上の判定部を目視するための窓が設けられる。さらに、外部から試料を多孔質担体上に導入できるように、中空の容器の一部を開放するか、または標識部を中心として、判定部の反対方向に多孔質担体が延長され、その一部が試料の導入部となるように、中空の容器から外部に露出される。図3は試験片の他の好ましい構成例を示す。標識部13は、13a、13b、および13cに分割されている。図示していないが、添加剤含浸部12は設けてある。

【0020】

【実施例】以下、本発明の実施例を詳細に説明する。

《実施例1》

【各部材の作製方法】

(1) 判定部のブロッキング剤及び洗浄剤の作製方法
蒸留水1Lにトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(以下Trisで表す)を0.1mol(12.11g)加えて攪拌した後、1NのHClによりpH8.2に調整し、ニトロセルロースの洗浄剤とした。また、前記の洗浄剤にスキムミルクを10g加えて攪拌し、ニトロセルロースのブロッキング剤とした。

【0021】(2) 判定部の抗体固定化方法

ニトロセルロースのシート(ミリポア社製:HFM SPHF04020)を大きさ0.9cm×1.2cmに裁断した厚さ約220μm(支持体を含む)のシートを担体とした。このシートの上に、試料導入部側から0.5cm、吸液部側から0.7cmの箇所に、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモンに対する抗hCGβ抗体(α-hCGβ)のリン酸緩衝溶液(以下PBS溶液で表す)(5mg/mL)を塗布し、40℃で8時間遮光状態で乾燥した。乾燥後、シートを上記のブロッキング剤に、ブロッキング剤が30シートあたり70mLの割合となるよう浸潤し、30℃で30分間シェイカーにてブロッキングした。ブロッキング後、上記の洗浄剤(70mL/30シート)により30℃で30分間洗浄する操作を3回繰り返した後、デシケータ内にて一晩乾燥した。

(3) 添加剤含浸部の作製方法

蒸留水1LにTrisを1mol(121.1g)加えて攪拌した後、1NのHClによりpH8.2に調整した。

これに塩化テトラメチルアンモニウム（以下TMAで表す）1mol（109.6g）とトリトン系界面活性剤 Triton X-100（以下Tritonで表す）の10%水溶液10mLを加えて攪拌し、pH8.2のTris(1M)-TMA(1M)-Triton(0.1%)溶液を作製した。これをガラス繊維濾紙を大きさ0.9cm×6.0cmに裁断したものに0.36mL含浸した後、凍結乾燥した。

【0022】(4) 標識部の作製方法

a) 抗hCG α 抗体 (α -hCG α) PBS溶液 (10mg/mL) にジチオビス (スルホスクシンイミジルプロピオネート) (以下DTSSPで表す) のPBS溶液 (4.06mg/0.1mL) をゆっくり滴下し、35℃で30分間攪拌した後、分子量分画カラム (ファルマシア社製: セファデックスG25M) にてゲル濾過した。

b) ゲル濾過後、抗hCG α 重合抗体のPBS溶液 (10mg/6mL) となった。これを4℃で保存した。

c) ウシ血清アルブミン (BSA) のPBS溶液 (110mg/mL) にジチオスレイトール (DTT) 77mgを加え、室温で30分間攪拌した後 (最終濃度7.7mg/mL)、速やかに分子量分画カラム (ファルマシア社製: セファデックスG25M) にてゲル濾過した。その結果、SH基の遊離したBSA (全体量24mL) 溶液を得た。

d) 前記SH基の遊離したBSA (全体量24mL) に、b) の4℃保存の抗hCG α 重合抗体のPBS溶液 (10mg/6mL) を混合し、4℃で20時間攪拌した。

e) 未反応のBSAを除くため分子量分画カラム (ファルマシア社製: セファクリルS300HR) にてゲル濾過した。抗hCG α 重合抗体-BSA (全体量40mL~50mL) が得られた。

f) これに上記化2に示したシアニン系色素 (以下SLIC3で表す) のPBS溶液 (350mg/2mL) をゆっくり滴下した後、4℃で20時間攪拌した。

g) 未反応のシアニン系色素を除くため分子量分画カラム50cmと150cm (ファルマシア社製: セファデックスG25M) にてゲル濾過した。抗hCG α 重合抗体-BSA-SLIC3 (全体量60mL~90mL) が得られた。これを標識抗体原液と呼ぶ。

h) 標識抗体原液に安定剤としてBSAとスクロースをそれぞれ1%添加した。

i) ガラス濾紙を大きさ0.9cm×5.0cmに裁断し、これに前記安定剤を添加した標識抗体原液を1シート当たり0.3mLの割合で含浸した後、凍結乾燥した。

j) 凍結乾燥後、遮光乾燥状態で保存した。

(5) 吸液部の作製方法

ガラス繊維濾紙を大きさ0.9cm×2.5cmに裁断し、これを6枚重ねて使用する。

【0023】 [試験片の作製方法] 図4に本実施例による試験片20の構造を示す。図4は、各構成材のサイズ

は必ずしも正確に表していない。大きさ0.9cm×5.5cmの両面テープを全面に張った大きさ0.9cm×5.5cm、厚さ0.5mmの白色硬質ポリ塩化ビニル製の裏打ち21の表面に、判定部26、その下流側に吸液部27、判定部26の上流側に標識部24をそれぞれ接着させた。また、標識部24の上流側にガラス繊維濾紙の大きさ0.9cm×0.5cmのもの23および添加剤含浸部22を順次接着させ、さらに標識部24から添加剤含浸部22の上部全体に、ガラス繊維濾紙の大きさ0.9cm×3.5cmのもの2枚をバイパス用多孔質体25として装着した。こうして得た試験片20を中空のケースに組み込んだ。

【0024】この試験片20は、添加剤含浸部22の端部側が試料導入部を兼ねている。試料を図の矢印28のように試験片へ添加すると、主に添加剤含浸部22からガラス繊維濾紙23、標識部24を経由して判定部26に至る流路29aと、バイパス用多孔質体25から標識部24の端部を経由するかまたはこれを越えて判定部26に至る流路29bとに流れる。図では、多孔質体25の端部には標識部24が接しているが、標識部を越えて直接判定部26に接するようにするのがより好ましい。

【0025】この構成によると、標識部24全体を通過する流路29aに比べて標識部24の端部を経由するかまたはこれを越えて判定部に至る流路29bとでは、後者の流路の方が障害が少なく、試料の流れは早く進行する。従って、前者の流路29aは、遅延された試料の流路である。そのため、試料を導入すると、標識部の抗体を殆ど含まない試料がまず判定部に達し、一定の時間が経過した後、試料によって溶出された標識抗体が判定部に達する。この遅延時間の間に、判定部では、あらかじめ抗原がある程度結合した状態で標識抗体と抗原の混合物を迎えることになり、少量の抗原しか存在していない場合でも効率的にこれを捕らえることが可能となる。その結果、視認性が高くなり、感度が向上する。この構成によれば、遅延時間を設けることによって、一見反応時間は増大することになるが、実際には担持する標識抗体の絶対量を増加させることなく感度向上が図れるので、バックグラウンド消失の時間が縮減され、全体としては反応時間は短縮されることになる。

【0026】《比較例1》図4の試験片のうち、添加剤含浸部22の代わりに23と同じガラス繊維濾紙を用い、さらにガラス繊維濾紙25を省いた他は実施例1と同じである。

【0027】上記実施例1の試験片及び比較例1の試験片を用いた免疫クロマトグラフィー装置について、感度、反応時間及び視認性の試験を行った。分析対象物は、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (hCG) である。測定濃度 (感度) は100,000 IU/L~0 IU/L、試料導入部に添加するhCG溶液量は0.45mLとした。この場合の反応時間とは、hCG溶液を試料導入部に添加して

から、固定化抗体の抗hCG β 抗体と標識抗体の抗hCG α 抗体とがhCGを介して反応し固定化部のラインが見え始めるまでの時間のことである。また、視認性の数値に関しては、反射吸光度測定（島津製作所製：CS-9300）によるもので、入射光550nm（SLIC3の吸収）に対する反射光の強度を測定している。基準値は未使用のニトロセルロースの吸光度であり、反射光強度の測定時間はクロマトグラフィー終了後30分以内である。

【0028】図5は視認性を上記吸光度で比較したものであり、図6は速度の比較を表している。また、図には表していないが、hCG濃度が10,000IU/Lの際には、比較例1では試料添加後30秒で吸光度が0.5に達したのに対し、本実施例では試料添加後20秒で吸光度が0.7に達した。これらの結果から、本発明による免疫クロマトグラフィー装置は、感度、速度及び視認性において従来例に相当する比較例1に比べて優れていることがわかる。

【0029】《実施例2》添加剤含浸部の作製方法において、実施例1のTris(1M)-TMA(1M)-Triton(0.1%)溶液の代わりにTris(1M)-TMA(1M)溶液を用いた他は実施例1と同様にして試験片を作製した。

【0030】《実施例3》添加剤含浸部の作製方法において、実施例1のTris(1M)-TMA(1M)-Triton(0.1%)溶液の代わりにTris(1M)-Triton(0.1%)溶液を用いた他は実施例1と同様にして試験片を作製した。

【0031】《比較例2》実施例2の添加剤含浸部の代わりに添加剤を含浸していない23と同じガラス繊維濾紙を用いた他は実施例2と同じとした試験片を作製した。

【0032】実施例2、3及び比較例2の試験片を用いた免疫クロマトグラフィー装置について、実施例1と同様の試験をした結果を図7～10に示す。また、添加剤含浸部の作製方法において、実施例1のTris(1M)-TMA(1M)-Triton(0.1%)溶液の代わりに各pHのTris溶液を用いた他は実施例1と同様にして試験片を作製した。こうして、あらかじめ定めた体積の試料を添加したとき試料のpHが各種の値となるようにした。試料分析時のpHと吸光度の関係を図11に示す。黒丸はpH8.2のときのプロットを表し、他はpH8.2以外のpH6.5～9.0のときのプロットを表す。ブランク発色(0IU/L)の原因は、負電荷を有する色素標識抗体と正電荷を有する固定化抗体との電氣的結合であるため、試験片に展開させる試料液をpH8.2に調整すると、固定化抗体の正電荷を打ち消すことが可能となり、さらに正電荷を有するTMAを添加すると、色素標識抗体の色素の負電荷を打ち消すことが可能となり、ブランクの発色を除去することができた(図7参照)。また、界面活性剤を添加することにより、発色と検出時間を短縮することができた(図10参照)。

【0033】《実施例4》標識部を次のようにして作製

した他は実施例1と同様にして試験片を作製した。

標識部の作成方法：実施例1の標識部の作製方法において、a)～k)の処理をした後、さらに次の処理をした。

k)凍結乾燥した標識部含浸濾紙を大きさ0.9cm×0.1cmに裁断した。これを標識部24cとした。

1)標識抗体原液をPBSで4倍に希釈したものを前記と同様の方法でガラス繊維濾紙に含浸した後、凍結乾燥し、大きさ0.9cm×0.1cmに裁断した。これらを標識部24aおよび24bとした。標識部24a、24b、24cを同一サイズのガラス繊維濾紙からなるスぺーサ30を挟んで図12のように配列して接着させた。

【0034】《実施例5》図13に示すように、実施例4における添加剤含浸部22を設けず、代わりにガラス繊維濾紙で構成した他は実施例4と同様にして試験片を作製した。まず、標識部を分割してことによる効果を実証するための比較実験の結果を示す。本実験で用いたのは、実施例5の試験片を用いた免疫クロマトグラフィー装置、および、標識部は分割せずに比較例用標識部をその判定部側を実施例5における標識部24cと同一の場所になるようにした他は実施例5と同様の試験片を用いた比較例の装置である。つまり、両者で用いた標識部および標識部に担持された標識抗体の全体量は同一である。分析対象物にはヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(hCG)を用いた。また、反応の呈色の測定は、反射吸光度測定（島津製作所製：CS-9300）によるもので、入射光550nm（SLIC3の吸収）に対する反射光の強度を測定している。0設定は未使用のニトロセルロースとした。0、50、1,000、10,000IU/Lの濃度に調整したhCGのリン酸緩衝液(PBS)を試験片の試料導入部へ添加し、装置を室温(25℃)中で水平に放置し、反応を検出した。

【0035】図14は試料添加3分後の各hCG濃度における吸光度(発色濃度)を測定した結果を示し、図15は試料を添加してから、判定とバックグラウンドでの吸光度の差が0.2になるまでの時間をプロットしたものである。図14に示されているように、hCG濃度の全域にわたり、本実施例の装置では高い発色を示している。特に、10,000IU/Lの高濃度領域において、比較例では発色が下がる誤動作が発生しているのに対し、本実施例ではこの濃度においても正常な発色が見られ、本発明による感度向上と、ダイナミックレンジの改善を示唆している。また、図15に示されているように、発色時間(反応時間)は、やはりhCG全域にわたり比較例より加速されている。また、図では表現されていないが、hCG濃度が10,000IU/Lの際には、比較例では試料添加後30秒で吸光度が0.5に達したのに対し、本実施例では試料添加後20秒で吸光度が0.7に達した。

【0036】次に、実施例4、5および実施例1の試験

片を用いたクロマトグラフィー装置の比較試験の結果を説明する。分析対象物にはヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(hCG)を用いた。前記と同様に視認性に関しては入射光 550nm に対する反射光の強度を測定した。0、50、100、1000、および10000 IU/Lの濃度に調整したhCGのリン酸緩衝液(PBS)を試験片の試料導入部へ添加し、室温(25℃)で水平に放置した。試料添加3分後の各hCG濃度における吸光度(発色強度)の比較を図16に示す。添加剤を組み込むとともに標識部を複数に分割した構成の実施例4は、どちらか一方を採用した実施例1および実施例5に比べて、発色強度が向上していることがわかる。また、誤動作の要因となる0 IU/Lにおける発色も完全に除去することができた。

【0037】

【発明の効果】以上のように本発明によれば、検出時の誤動作の要因となりうるバックグラウンドの着色やブランク発色を完全に除去することができる。従って、本発明の免疫クロマトグラフィー装置を用いれば、あらゆる液体試料中の抗原を正確にかつ迅速に検出することができる。また、本発明によれば、標識抗体を最適な条件で反応に用いることが可能となり、検出速度の向上、検出感度の増加、および検出感度のダイナミックレンジの拡大を同時に達成することが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【図1】従来の免疫クロマトグラフィー装置の試験片を示す斜視図である。

【図2】本発明の免疫クロマトグラフィー装置に用いる試験片の構成例を示す斜視図である。

【図3】本発明の免疫クロマトグラフィー装置に用いる試験片の他の構成例を示す斜視図である。

【図4】実施例に用いた試験片の縦断面図である。

【図5】試料中のhCG濃度と判定部における吸光度(発色強度)との関係を比較したグラフである。

10

【図6】試料中のhCG濃度と検出可能な最短時間との関係を比較したグラフである。

【図7】試料中のhCG濃度と判定部における吸光度との関係を比較したグラフである。

【図8】試料中のhCG濃度と検出可能な最短時間との関係を比較したグラフである。

【図9】試料中のhCG濃度と判定部における吸光度との関係を比較したグラフである。

【図10】試料中のhCG濃度と検出可能な最短時間との関係を比較したグラフである。

【図11】試験片に展開する試料液のpHを変えたときの試料中のhCG濃度と判定部における吸光度との関係を示すグラフである。

【図12】他の実施例に用いた試験片の縦断面図である。

【図13】さらに他の実施例に用いた試験片の縦断面図である。

【図14】試料中のhCG濃度と判定部における吸光度との関係を比較したグラフである。

【図15】試料中のhCG濃度と検出可能な最短時間との関係を比較したグラフである。

【図16】試料中のhCG濃度と判定部における吸光度との関係を比較したグラフである。

【符号の説明】

10、20 試験片

11 試料導入部

12、22 添加剤含浸部

13、24 標識部

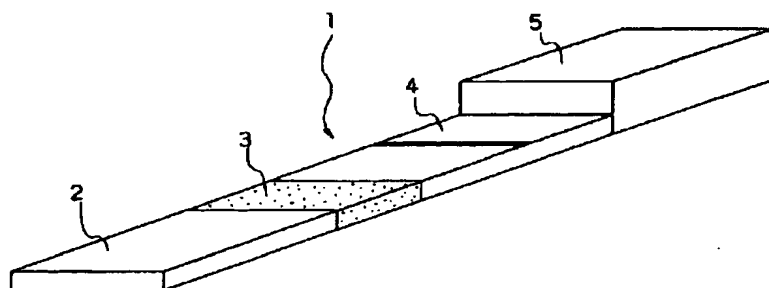
14、26 判定部

15 固定化部

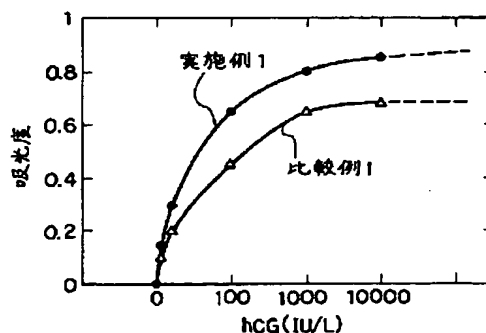
16、27 吸液部

29b バイパス流路

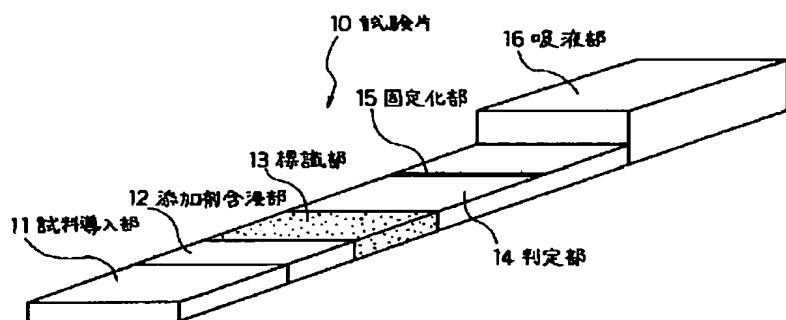
【図1】



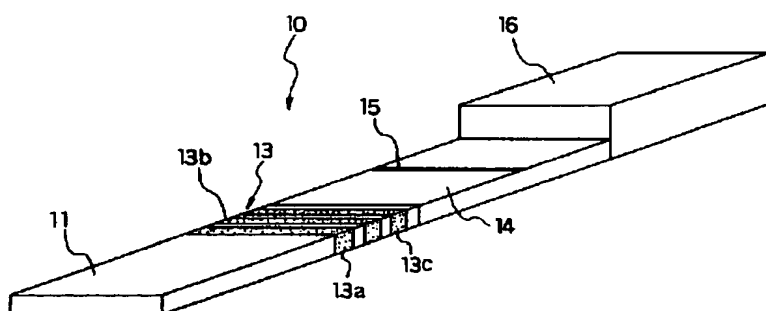
【図5】



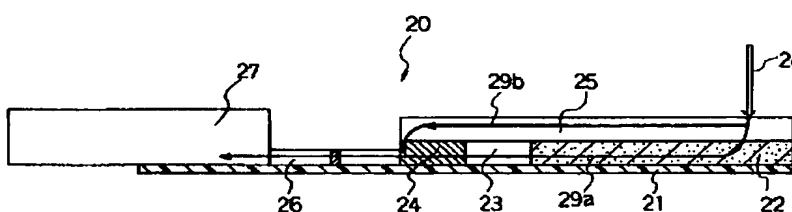
【図2】



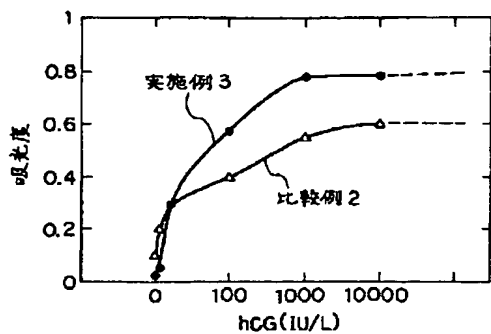
【図3】



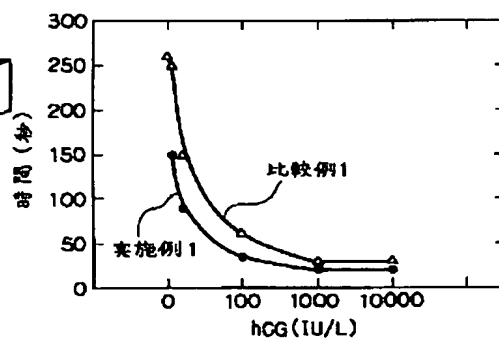
【図4】



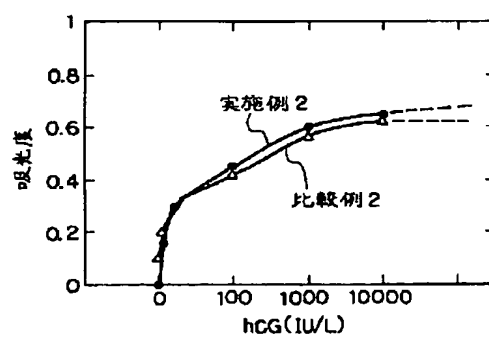
【図9】



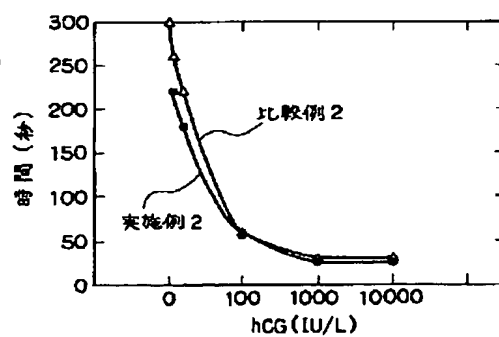
【図6】



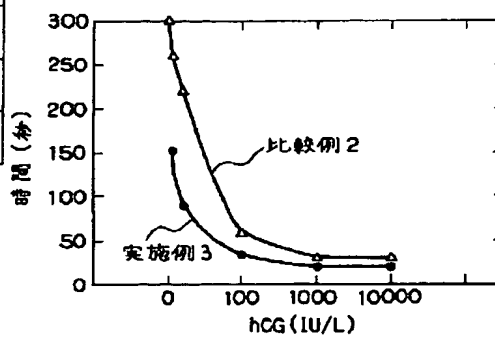
【図7】



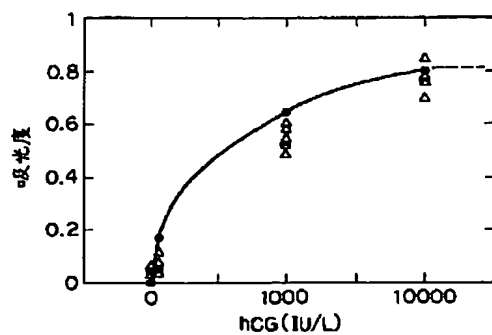
【図8】



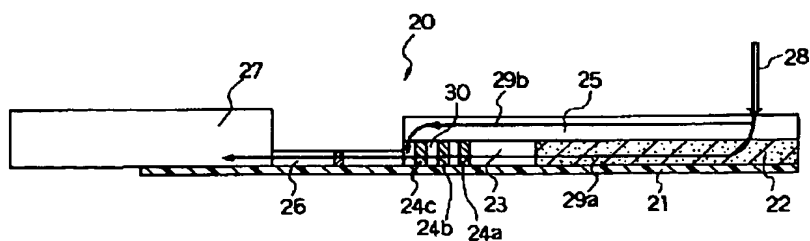
【図10】



【図11】

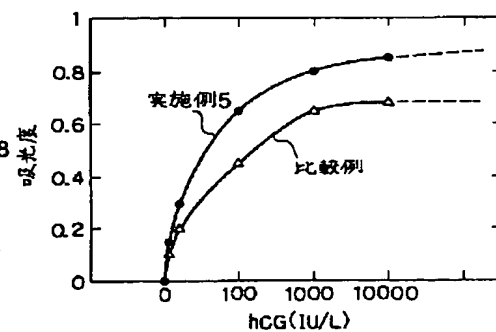
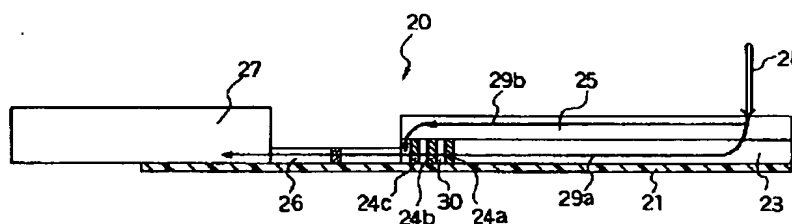


【図12】

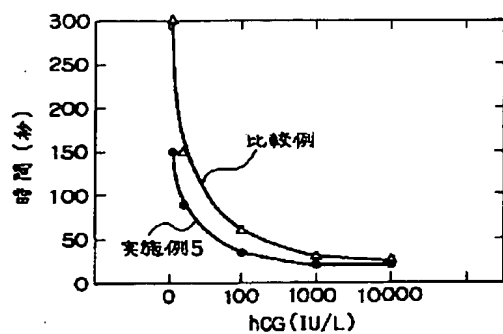


【図14】

【図13】



【図15】



【図16】

